

転写制御因子 BRD4 を標的とした中分子すい癌治療薬の開発

所属： 横浜市立大学 大学院生命医科学研究科

助成対象者： 小沼 剛

概要

これまでの研究で、BRD4 の ET ドメインに結合する中分子ペプチド阻害剤を開発してきた。本研究において、これまでのペプチドを発展させ、1nM という極めて強く結合する環状ペプチド (cMLV_04) の開発に成功した。そこで、構造学的知見から cMLV_04 の ET ドメインへの結合様式を理解するため、核磁気共鳴法 (NMR) を利用して複合体の立体構造解析を行った。次に、cMLV_04 の抗腫瘍効果を確認するために細胞レベルでの評価を行ったところ、全く活性を示さなかつた。そこで cMLV_04 の活性を高めるために細胞膜透過ペプチドを融合した新たなペプチド (ETDi-TAT) を開発した。その結果、膀がん細胞に対して抗腫瘍効果を示し、その IC₅₀ は数 μ M であった。

abstract

In previous studies, we have developed a medium-sized peptide inhibitor that binds to the ET domain of BRD4. In this study, we have developed a cyclic peptide (cMLV_04) that binds extremely strongly (1 nM), expanding on the previous peptides. In order to understand the binding mode of cMLV_04 to the ET domain from structural findings, we performed a conformational analysis of the complex using nuclear magnetic resonance (NMR). Next, to confirm the anti-tumor effect of cMLV_04, we evaluated it at the cellular level and found that it showed no activity at all. Therefore, we developed a new peptide (ETDi-TAT) fused with a cell membrane-permeable peptide to enhance the activity of cMLV_04. As

a result, it showed anti-tumor effect against pancreatic cancer cells, and its IC₅₀ was several μ M. We plan to evaluate the activity of ETDi-TAT using an individual pancreatic cancer model, *Drosophila melanogaster*.

研究内容

「背景」

肺がんは、患者の 5 年生存率が 12.5%に留まる代表的な難治がんである。我が国を含め先進国において肺がんの死亡者数は増加傾向にあり、肺がんの新規治療法や予防法の開発は喫緊の福祉課題となっている。肺がん細胞では、がん原遺伝子である *MYC* が過剰に発現しており、その発現量と肺がん患者の生存率には負の相関があることが知られている (Witkiewicz, *Nat Commun* 2015)。また、転移性の高い肺がんほど *MYC* の発現量が高いことも確認されている (Maddipati, *Cancer Discov* 2022)。これらの結果は *MYC* が肺がんの治療標的の有力な候補であることを示唆しているが、*MYC* はドメイン構造を有しない典型的な天然変性タンパク質であるため、*MYC* に直接結合してその活性を阻害する化合物の開発は困難である。

そこで本研究では、*MYC* を標的遺伝子として発現誘導機能を持つ転写制御因子 BRD4 (bromodomain-containing protein 4) に着目し、その阻害剤を肺がんの新規治療薬候補として開発する。申請者はこれまで BRD4 のプロモドメインや ET ドメインに対する阻害剤開発に取り組み、世界に先駆けて ET ドメイン-低分子化合物複合体の構造解析に成功している。本研究ではこれらの実績に基づき、肺がん治療薬シーズとして ET ドメイン阻害剤の創出を目指す。

「目的」

BRD4 は、2 つの Bromodomain (BrD) と 1 つの Extra-terminal domain (ETD) を有する (図 1)。BrD はアセチル化されたヒストンに結合し、ETD は転写関連因子をクロマチンにリクルートする。BRD4 は急性骨髓性白血病など複数のがん種の治療標的として知られ、BrD を標的とする阻害剤 (BrD inhibitor: BrDi) が 13 種治験中である。しかし、これらの阻害剤は 2 つの BrD に対する選択性に乏しく、両方の BrD に結合することで強い副



図 1. BRD4 の一次配列における BrD と ETD 領域

作用を招来する。このような状況から ETD を標的とする治療戦略が有用と考えられているが、ETD 阻害剤 (ETD inhibitor: ETDi) の報告はいまだない。そこで本研究にて、中分子ペプチドを利用した ETDi の開発を行うこととした。

「結果」

新規中分子ペプチドの合成およびスクリーニング

申請者はこれまでに約 30 nM の解離定数で ETD に結合するペプチド MLV_11 の開発に成功していた（図 2）。そこでこのアミノ酸配列をベースとして、アミノ酸置換や環状化を行なった複数の中分子ペプチドを合成した。それらの解離定数を等温滴定型熱量計 (ITC) もしくは流動誘起分散解析 (FIDA) システムで測定および比較を行い、約 1 nM という極めて強く ETD に結合する環状ペプチド cMLV_04 の開発に成功した（図 3）。さらに、cMLV_04 のアミノ酸配列について Deep Mutational Scanning (DMS) を実施し、R6I と G18W の変異が結合力の向上に効果的であるとの予測が得られたので（図 4）、cMLV_04 の変異体である cMLV_04 R6I、cMLV_04 G18W、cMLV_04 R6I/G18W の環状ペプチドを合成し、表面プラズモン共鳴 (SPR) 測定から ETD に対する解離定数を見積もった。しかしながら、いずれも cMLV_04 より強く結合しなかった。ここまでに合成した中分子ペプチドの中で ETD に最も強く結合した cMLV_04 を最も良い阻害剤とし、細胞を用いた活性測定を行うこととした。

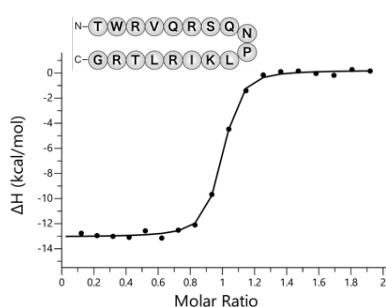


図 2. MLV_11 は ETD と $K_d = 30 \text{ nM}$ で結合する。
MLV_11 のアミノ酸配列
(上図) と ITC プロファイ
ル (下図)。

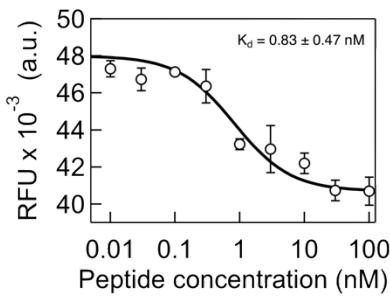


図 3. cMLV_04 は ETD と
 $K_d = \sim 1 \text{ nM}$ で結合する。
FIDA システムによって測
定された。

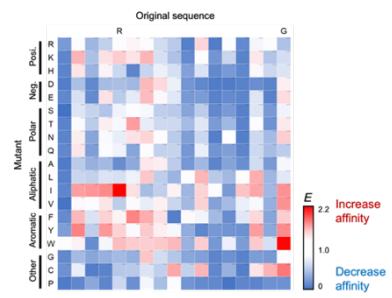


図 4. cMLV_04 のアミノ酸
配列最適化のために行なった
DMS の結果。R6I、G18W の
変異がそれぞれ効果的である
ことが予想された。

cMLV_04 と ETD の複合体構造解析

cMLV_04 と ETD の結合様式を理解するため、cMLV_04-ETD 複合体の立体構造解析を行なった。まずは X 線結晶構造解析による複合体の構造解析を行うため、600 条件下でその結晶化を試みたが、結晶が得られなかった。そのため X 線結晶構造解析は諦め、核磁気共鳴

法 (NMR) による立体構造解析を行ったところ、解析に成功した (図 5)。この複合体において、cMLV_04 は分子内 β シート構造を、さらに ETD と分子間 β シート構造を形成していることが明らかとなった。

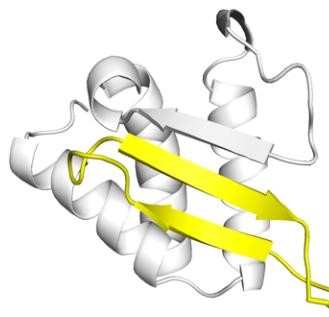


図 5. cMLV_04 (黄色) と ETD (白色) の複合体 NMR 構造。

がん細胞を用いた cMLV_04 の抗腫瘍効果の評価

cMLV_04 の抗腫瘍効果を細胞レベルで評価するため、評価系がすでに確立している急性骨髓性白血病細胞株 (MOLM13) をまずは用いることとした。MOLM13 の培地に cMLV_04 を $1\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 、 $100\mu\text{M}$ となるように加え、3 日後の細胞生存率を比較した (図 6)。

しかしながら、いずれの濃度においても抗腫瘍効果がなかった。この主な原因として、cMLV_04 がペプチドという中分子であるために細胞内に浸透できなことが考えられる。そこで膜透過ペプチドとしてよく知られている 3 種 (TAT、Penetratin、PTD4) を、cMLV_04 にそれぞれ融合したペプチド (ETDi-TAT、ETDi-Pen、ETDi-PTD4)、さらに核移行シグナル (NLS) を追加したペプチド (ETDi-TAT-NLS、ETDi-Pen-NLS、ETDi-PTD4-NLS)、合計 6 種類をあらたに合成した。この際、ETDi-Pen-NLS は十分量得られなかつたため、残りの 5 種を MOLM13 の培地に加え、細胞生存率を比較した (図 6)。その結果、いずれのペプチドでも抗腫瘍効果を確認でき、中でも ETDi-TAT、ETDi-TAT-NLS が最も強い抗腫瘍効果を示した。

続いて、ETDi-TAT について 3 種の肺がん細胞株 (AsPC-1、MIA PaCa-2、BxPC-3) に対する抗腫瘍効果を定量的に評価した (図 7)。その結果、IC₅₀ が AsPC-1 に対しては $6.8\mu\text{M}$ 、MIA PaCa-2 に対しては $9.5\mu\text{M}$ 、BxPC-3 に対しては $10.1\mu\text{M}$ だった。

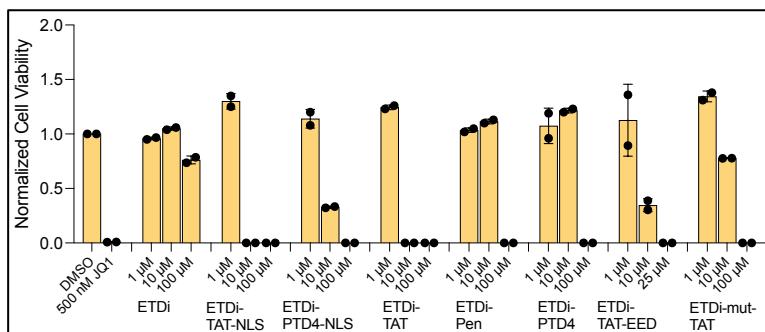


図 6. cMLV_04 の MOLM13 に対する抗腫瘍効果。

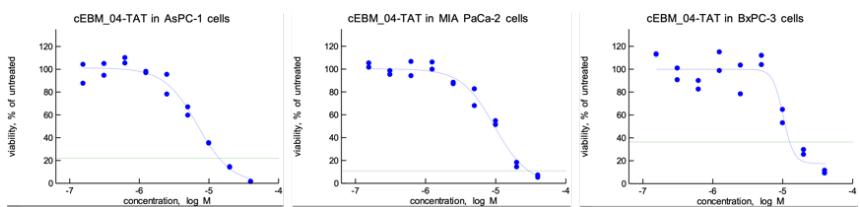


図 7. cMLV_04 の肺がん細胞に対する抗腫瘍効果。AsPC-1 (左)、MIA PaCa-2 (中央)、BxPC-3 (右) の細胞増殖アッセイ

「今後」

本研究を実施したことで、中分子ペプチド阻害剤と BRD4 ET ドメインとの複合体形成について原子レベルでの理解を達成した。その結果、ET ドメインは膵がん治療薬として魅力的な標的であり、その阻害剤開発に向けた構造基盤を十分に確立できたと言える。また、膜透過ペプチドを融合した ET ドメイン阻害剤を開発し、膵がん細胞レベルで活性があることを確認した。計画ではショウジョウバエを用いた活性評価を行う予定であったが、新規中分子ペプチド cMLV_04 に至るまでに時間を要したこと、また個体の前に膵がん細胞株にて活性を評価する必要があったことからショウジョウバエを用いた活性評価までは実施できなかった。本年度の成果を、個体である膵がんモデルショウジョウバエで活性を確認していくことが今後の課題である。

引用文献

Agnieszka K Witkiewicz, Elizabeth A McMillan, Uthra Balaji, GuemHee Baek, Wan-Chi Lin, John Mansour, Mehri Mollaee, Kay-Uwe Wagner, Prasad Koduru, Adam Yopp, Michael A Choti, Charles J Yeo, Peter McCue, Michael A White, Erik S Knudsen “Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets” *Nat. Commun.* 6, 6744 (2015)

Ravikanth Maddipati, Robert J Norgard, Timour Baslan, Komal S Rathi, Amy Zhang, Asal Saeid, Taku Higashihara, Feng Wu, Angad Kumar, Valli Annamalai, Saurav Bhattacharya, Pichai Raman, Christian A Adkisson, Jason R Pitarresi, Maximilian D Wengyn, Taiji Yamazoe, Jinyang Li, David Balli, Michael J LaRiviere, Tuong-Vi C Ngo, Ian W Folkert, Ian D Millstein, Jonathan Bermeo, Erica L Carpenter, John C McAuliffe, Maja H Oktay, Rolf A Brekken, Scott W Lowe, Christine A Iacobuzio-Donahue, Faiyaz Notta, Ben Z Stanger, “MYC Levels Regulate Metastatic Heterogeneity in Pancreatic Adenocarcinoma” *Cancer Discov.* 12, 542 (2022)

本助成に関わる成果物

[論文発表]

なし

[口頭発表]

なし

[ポスター発表]

なし

[その他]

なし